

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11602

研究課題名(和文) 侵襲時の生体防御不全対策：PPARを分子標的とした自然免疫応答の制御

研究課題名(英文) The therapeutic strategy for burn-induced immunosuppression: PPARgamma activation for control of innate immune response

研究代表者

宮崎 裕美 (MIYAZAKI, HIROMI)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・防衛医学研究センター・助教)

研究者番号：30531636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：重度侵襲である広範囲熱傷後にはマクロファージの機能不全が生じ、生体防御能が破綻し感染などへの抵抗性が減弱すると言われている。転写因子PPAR $\gamma$ はマクロファージに発現しており、抗炎症性作用や細胞機能を調節することが知られている。本研究では、重症熱傷後の細菌感染におけるPPAR $\gamma$ の役割について検討した。熱傷後にPPAR $\gamma$ アゴニストを投与すると、Kupffer細胞と骨髄由来の遊走マクロファージが増加した。また、PPAR $\gamma$ アゴニストはKupffer細胞と遊走マクロファージの機能を調節し、炎症性サイトカイン産生を減弱し細菌クリアランスを増強することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度侵襲後には生体防御能が減弱し易感性となり、感染症の合併が過剰な炎症や免疫麻痺を引き起こし予後さらに不良としている。本研究により、炎症反応のみならず食細胞の細菌排除機能を調節する機序を明らかにしたことは、感染症合併を回避・軽減する新たな切り口として、重症病態の治療に関する研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Severe burn injury causes the Kupffer cells dysfunction and attenuates the host defense against bacterial infections. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR $\gamma$ ) is abundantly expressed in macrophages and plays a critical role for regulation of immune responses during the inflammation. We herein investigated the role of PPAR $\gamma$  during the inflammatory response in post-burn bacterial infection.

We reported that pioglitazone, a specific ligand and agonist for PPAR $\gamma$ , strongly activates resident Kupffer cells and recruited macrophages in the liver of burn-injured mice. In addition, we found that PPAR $\gamma$  agonist alleviated burn-induced infectious sensitivity and decreased mortality against gram-negative bacterial sepsis via a mechanism dependent on suppressing proinflammatory cytokine production and enhancing bacterial clearance in the liver.

研究分野：救急医学

キーワード：マクロファージ 殺菌活性 敗血症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

重症病態では、全身の免疫機能が著しく損なわれ生体防御機構の破綻が生じる。そのため、時間の経過とともに感染の合併率は上がり、敗血症から致死的な多臓器不全へと移行しやすい。事実、重度侵襲である広範囲熱傷の主な死因は免疫機能低下に起因する重症感染症であり、侵襲に伴う免疫系の応答を効果的に賦活化し感染症の併発を防ぐ対策・治療戦略の確立は、救急・集中治療領域において重要な課題である。これまでの敗血症対策は、炎症応答を抑制するという観点からの治療であったが、これらを制御する治療の有効性を検討した臨床試験はすべて失敗に終わっている。また、侵襲による生体防御能の破綻と感染抵抗性の減弱化の機序は未だ詳細には解明されておらず、有効な対策が見出せていない。これらの背景から、感染防御に重要な自然免疫機構、特に病原体を直接排除する好中球やマクロファージの機能制御に着目した侵襲時の易感染病態対策を講じることは、重度侵襲患者の予後改善に極めて有用な研究である。転写調節因子 PPAR $\gamma$  は抗炎症作用を示し、酸化ストレスの軽減、アポトーシスや菌の排除にも寄与する可能性が示唆されている。したがって、PPAR $\gamma$  を標的とした免疫応答制御について検討することは、重度侵襲時の感染性合併症の発生、救命率の向上を目指した治療戦略の確立にきわめて有用な研究であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、侵襲後の生体防御不全に対し新たな治療戦略の提案を目指し、炎症反応調節因子 PPAR $\gamma$  を介した自然免疫応答の制御が重度侵襲時の感染性合併症の発生、救命率の向上に有用な手段となり得るか明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

重度侵襲である広範囲熱傷による易感染病態の発症機序について、炎症を制御する各種因子の上流にあり、生体応答を制御している転写調節因子 PPAR $\gamma$  に着目し下記の検討を行う。

#### ① 広範囲熱傷後の自然免疫機能低下に対する PPAR $\gamma$ 活性化剤の投与効果

マウス広範囲重症熱傷モデルに対し、PPAR $\gamma$  活性化剤 (ピオグリタゾン) を投与し、受傷 5 日後に肝臓単核球をフローサイトメトリーにて細胞の組成を評価した。また、マクロファージの貪食殺菌活性を蛍光標識大腸菌あるいは pH 応答性蛍光標識大腸菌を用いて検討した。非熱傷群を陰性対照群とした。

#### ② 熱傷受傷後の細菌感染に対する PPAR $\gamma$ 活性化剤または阻害剤の投与効果

研究①と同様にマウス熱傷モデルにピオグリタゾンあるいは阻害剤 (GW9662) を投与し、受傷 5 日後に大腸菌を尾静脈から接種する感染モデルを作成し、7 日後までの予後を評価した。また、血中及び肝臓中の差異菌数を測定した。また、血中サイトカイン濃度の変動を経時的に評価した。

### 4. 研究成果

重症熱傷により肝臓の CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>high</sup> の組織常在型 Kupffer 細胞は減少しており CD11b<sup>high</sup> F4/80<sup>low</sup> 単球由来マクロファージが増加していた。また、蛍光標識された大腸菌を取り込んだ Kupffer 細胞および単球由来マクロファージの数が著しく減少していた。さらに、Kupffer 細胞および単球由来マクロファージいずれも pH 応答性蛍光標識された大腸菌の MFI が非熱傷群に対して低値を示した。このことは、ファゴライソソームの形成が不十分であり殺菌活性が減弱していることを示唆している。一方、ピオグリタゾン投与群では、未治療群に比べ Kupffer 細胞および単球由来マクロファージの細胞数が増大しており、大腸菌の取り込みも亢進していた。また、Kupffer 細胞および単球由来マクロファージの pH 応答性蛍光標識された大腸菌の MFI は非熱傷群に類似したパターンを示し、ファゴライソソームの形成が促進されていた。

そこで、CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>high</sup> 細胞と CD11b<sup>high</sup> F4/80<sup>low</sup> 細胞を分取し RNA を抽出後、定量的遺伝子発現解析を行った。その結果、未治療群と比較してピオグリタゾン投与群では、CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>high</sup> 細胞、CD11b<sup>high</sup> F4/80<sup>low</sup> 細胞いずれの細胞集団においても、M2 型マクロファージの遺伝子マーカーとして知られる *CR1g*、*Ym-1*、*MR* 遺伝子などの発現が有意に上昇していた。

熱傷後にピオグリタゾンを投与することによって、肝臓の食細胞機能に影響を与えることが明らかとなったため、マウス熱傷モデルにおいて最も食細胞機能が低下する受傷 5 日後に大腸菌による細菌感染を合併させると、ピオグリタゾン投与群では炎症性サイトカイン TNF と IL-10 の産生が減少し、サイトカインストームを回避することができた。また、ピオグリタゾン投与によって血液中および臓器中の生菌数も減少しており、菌クリアランスが改善していた。これらの結果が細菌感染による予後を改善したと考えられる。一方、PPAR $\gamma$  阻害剤を投与したモデルでは未治療群と同様の結果を示した。

以上のことから、PPAR $\gamma$  活性化剤ピオグリタゾンは、肝臓の Kupffer 細胞と単球由来の遊走マクロファージを M2 型マクロファージへと分化させ、細菌除去能力に優れ、かつ、過剰な炎症を抑制する機能を獲得することが明らかとなった。PPAR $\gamma$  活性化を介した自然免疫応答の制御は、重症

熱傷後の細菌感染の予後を改善する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hung Yung-Li, Miyazaki Hiromi, Fang Shih-Hua, Li Chia-Yang, Suzuki Katsuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 The Structural Characteristics of Green Tea Polyphenols on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Nutritional Biology	6. 最初と最後の頁 151-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18314/jnb.v4i1.1079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Manabu, Nakashima Hiroyuki, Nakashima Masahiro, Koga Minori, Toda Hiroyuki, Koiwai Kazuki, Morimoto Yuji, Miyazaki Hiromi, Saitoh Daizoh, Suzuki Hiroaki, Seki Shuhji	4. 巻 9
2. 論文標題 The reduced bactericidal activity of neutrophils as an incisive indicator of water-immersion restraint stress and impaired exercise performance in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41077-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Miyazaki Hiromi, Kinoshita Manabu, Tomura Satoshi, Seki Shuhji, Saitoh Daizoh
2. 発表標題 Coenzyme Q10 improves susceptibility to methicillin-resistant Staphylococcus aureus bloodstream infection in extensive burned mice by modulating intestinal immunity
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎裕美、木下学、山本順寛、戸村哲、関修司、齋藤大蔵
2. 発表標題 重症病態におけるミトコンドリアの代謝制御と免疫系への作用
3. 学会等名 第33回日本外傷学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎裕美、木下学、戸村哲、関修司、齋藤大蔵
2. 発表標題 シンポジウム：自然免疫応答の制御による重度侵襲後の敗血症対策
3. 学会等名 第33回日本Shock学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎裕美、木下学、瀬野宗一郎、関根康雅、戸村哲、関修司、齋藤大蔵
2. 発表標題 核内受容体活性化を介した自然免疫調節による重症熱傷後の敗血症対策
3. 学会等名 第46回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎裕美、木下学、関根康雅、瀬野宗一郎、戸村哲、関修司、齋藤大蔵
2. 発表標題 パネルディスカッション侵襲を制御する：熱傷後の敗血症に対する自然免疫応答制御の有効性
3. 学会等名 第45回日本救急医学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎裕美、木下学、戸村哲、瀬野宗一郎、関修司、齋藤大蔵
2. 発表標題 Coenzyme Q10 supplementation protects against methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in burn-injured mice
3. 学会等名 第46回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 大蔵  (Saitoh Daizoh)  (90531632)	防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授   (82406)	
研究分担者	小野 聡  (Ono Satoshi)  (30531355)	東京医科大学・医学部・兼任教授   (32645)	
研究分担者	木下 学  (Kinoshita Manabu)  (70531391)	防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授   (82406)	